

**Verhalten von Cer-, Lanthan-
und anderen Metall-Ionen
gegenüber Peptiden und Aminosäuren**

Ana Rother

Verhalten von Cer-, Lanthan- und
anderen Metall-Ionen gegenüber
Peptiden und Aminosäuren

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München



vorgelegt
von
Ana Rother

aus
Brandenburg/Havel

Januar 1958

Vorleser von Law, Berlin - und
anderer Metall-Lager gegenseitig
Verfahren der Anwesenheit

Landwirtschafts-Universität
für
Erzeugung der Ernternte
der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Landwirtschaftlichen Universität
zu München



Verlag
von
Ans Robert

Berichterstatter: Prof.Dr.E.Bamann
Tag der mündlichen Prüfung: 26.Februar 1958.

1. Einleitung	1
2. Theoretischer Teil	2
3. Wirkung von Nigepilinen durch Tautog soda 3- und 4-wertigen Ionen	1
4. Verhalten geladener Kristalle gegenüber Verbindungen mit geladenen Ionen	1
Die vorliegende Arbeit ist am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München unter Leitung seines Direktors, Herrn Professor Dr.E. B a m a n n , angefertigt worden. Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr.E. B a m a n n , bin ich aufrichtig zu tiefem Dank verbunden für die wohlwollende Förderung und wertvolle Unterweisung, die ich von ihm erfahren durfte. Gleichzeitig erlaube ich mir, Herrn Professor Dr.L. H ö r h a m m e r , Direktor des Institutes für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, für die wichtigen Anregungen, die ich in seinem akademischen Unterricht erhalten habe, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen. Bei dieser Gelegenheit möchte ich nicht versäumen, Herrn Dr.H. T r a p m a n n herzlichst für die ständige Beratung und unermüdliche Hilfsbereitschaft zu danken, die er mir bis zur Fertigstellung dieser Arbeit erwiesen hat.	
5. Zusammenfassung	25
6. Der Versuchsaufbau	27
7. Bei der titrimetrischen Methode	27
8. Bei der chromatographischen Methode	27
9. Titrimetrische Methode	28
10. Chromatographische Methoden	28
11. qualitative	28
12. quantitative	28
13. Anhang: Chromatographische Abbildungen	30
14. Literaturverzeichnis	31

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung	1
B. Theoretischer Teil	1
I. Spaltung von Dipeptiden durch Lanthan sowie 3- und 4-wertiges Cer	1
II. Verhalten seltener Erdmetalle gegenüber Verbindungen mit peptidartiger Bindung	5
1. Hippursäure	5
2. Barbitursäure	6
III. Metallkomplexe der Aminosäuren	7
C. Spezieller Teil	10
I. Ergebnisse der metallkatalytischen Peptidspaltung	10
II. Einfluss seltener Erdmetalle auf die (C-N)-Bindung in der Hippursäure und der Barbitursäure	17
1. Bei der Hippursäure	17
2. Bei der Barbitursäure	17
III. Die Stabilität der Metallkomplexe eini- ger Aminosäuren	18
1. Verhalten verschiedener Metall-Ionen mit Glykokoll	19
2. Bei Alanin, Valin und Glutaminsäure	22
3. Bei Methionin	22
4. Bei Histidin	24
D. Methodischer Teil	25
I. Substrate	25
1. Peptide	25
2. Aminosäuren	26
3. Hippursäure	26
4. Barbitursäure	26
II. Metallsalze	26
III. Der Versuchsansatz	27
1. Bei der titrimetrischen Methode	27
2. Bei der chromatographischen Methode	27
IV. Titrimetrische Methode	28
V. Chromatographische Methoden	28
1. qualitative	28
2. quantitative	28
E. Anhang: Chromatographische Abbildungen	30
F. Literaturverzeichnis	39

A. E i n l e i t u n g

Im Bereich der Eiweißchemie sind die Säure- und die Alkali-Hydrolyse für die Aufspaltung der Peptide wohl die gebräuchlichsten Methoden. Verdienten Forschern auf dem Gebiete der Biochemie gelang die Entdeckung der enzymatischen Zerlegung von Eiweißverbindungen als einer weiteren Möglichkeit zur Hydrolyse und Charakterisierung dieser hochwichtigen Stoffklasse.

Diesen bewährten Methoden stellen wir eine neue an die Seite:

Die Zerlegung der (C-N)-Bindung durch Metallionen.

Es wird damit zugleich ein Beitrag gegeben zu dem umfassenden Fragenkomplex der M e t a l l i o n e n - K a t a l y s e, welcher seit einer Reihe von Jahren von zahlreichen Wissenschaftlern in Europa und Übersee erfolgreich bearbeitet wird.

Sinn und Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, erste, grundlegende Befunde dieses neuen Arbeitsgebietes darzulegen und dem weiteren Studium der sich anbietenden Probleme die Wege zu öffnen.

B. Theoretischer Teil

I. Spaltung von Dipeptiden durch Lanthan sowie 3- und 4-wertiges Cer

Der katalytische Wirkungsbereich der seltenen Erdmetalle findet eine wesentliche Erweiterung durch Befunde, die wir an Peptiden erheben konnten. Cer(III)- und Cer(IV)-Ionen sind in der Lage, im schwach alkalischen Milieu und bei niederen Temperaturen (37°C) die (C-N)-Bindung zu lösen. Bei Lanthan tritt diese "peptidatische" Aktivität im allgemeinen erst bei etwas höheren Temperaturen (70°C) in Erscheinung (10).

Das Spaltungsvermögen der drei angewandten Katalysatoren

ist sehr verschieden: Cer(IV)-Ion verursacht die rascheste Spaltung. Cer(III) besitzt ebenfalls stark ausgeprägte peptidatische Eigenschaften, doch ist diese Oxydationsstufe des Cers nicht so wirksam in der Zerlegung der (C-N)-Bindung wie das vierwertige Cer. Lanthan zeigt demgegenüber ein viel geringeres Spaltungsvermögen.

Dieses verschiedenartige Verhalten der Lanthan- und Cer-Salze und besonders das der zwei Oxydationsstufen des Cers lenken die Aufmerksamkeit auf sich. Für eine Erklärung dieser Befunde stellt sich uns die Frage:

Welche Aussagen können über die Entstehung und die chemische Natur der durch Reaktion der Dipeptide mit den seltenen Erdmetall-Katalysatoren entstehenden Zwischenprodukte sowie über deren Zerfall gemacht werden?

Das Reaktionszwischenprodukt könnte so entstehen, dass sich Lanthan-, bzw. Cer(III)-, bzw. Cer(IV)-Ionen mit dem Dipeptid über die Carboxyl-Gruppe in Form einfacher Salze vereinigen; dabei entfielen eine Sonderheit für das Cer(IV)-Ion: Das zerfallende Zwischenprodukt würde sich also bei den drei Katalysatoren nach gleicher Art durch Anlagerung an die Carboxyl-Gruppe bilden und die den Umsatz bedingenden Konstanten (Affinitäts- und Zerfallskonstante) wären dann bei der Cer(IV)-Zwischenverbindung einzeln oder gemeinsam bedeutend grösser als im Falle der Cer(III)- oder der Lanthan-Katalyse. Experimentelle Befunde legen aber nahe, für die Cer(IV)-Katalyse einen besonderen Reaktionsmechanismus anzunehmen:

Bei der Reaktion zwischen Cer(IV)-Salz und Dipeptid wird die freie Carboxyl-Gruppe des Dipeptids nicht an das Metall-Ion gebunden; sie ist nämlich bei der Titration in alkoholischem Milieu (80) schon bei der Null-Stopppung zu erfassen, liegt also in freier Form vor. Die Verknüpfung des Cer(IV)-Salzes mit dem Dipeptid wird daher durch koordinative Bindung der freien Elektronenpaare der Stickstoffatome erfolgen, d.h. mit je einem Elektronenpaar der Amino- und der Imino-Gruppe.

Bei der Reaktion zwischen Lanthan- bzw. Cer(III)-Ionen mit dem Dipeptid wird die Carboxyl-Gruppe im Null-Wert nicht erfasst,

sie ist also hier an der Bindung des Peptids an den Metall-
ionen beteiligt; jedoch unterscheiden sich diese beiden
Metall-Ionen hinsichtlich ihrer Auswirkung: Der Umsatz der
Cer(III)-Peptid-Verbindung ist bei der von uns gewählten Sub-
stratkonzentration wesentlich grösser als derjenige der Lanthan-
Verbindung. Bei der Verwendung von Cer(III) als Katalysator
beobachtet man schon nach sehr kurzen Versuchszeiten die Entste-
hung der freien Carboxyl-Gruppe; mit Lanthan tritt diese Erschei-
nung erst nach längerer Versuchszeit und ausschliesslich bei 70°C
auf.

Zunächst überrascht die viel stärkere Wirkung des Cer(IV):
Auf Grund der weit geringeren Basicität dieses Ions vollzieht
sich nämlich schon ab pH = 2,65 die Ausfällung als Hydroxyd, wäh-
rend dies bei Cer(III) erst bei pH = 5,68 und bei Lanthan bei
pH = 6,6 der Fall ist (68). Man muss daraus folgern, dass das
Cer(IV) in unserem Versuchsmilieu (pH = 8) weit mehr der kataly-
tischen Reaktion entzogen wird als die Cer(III)- und die Lanthan-
Ionen. Mit anderen Worten: Die Tendenz des Cer(IV)-Ions zur Bil-
dung von Cer(IV)-Hydroxyd ist weitaus grösser als sein Anlage-
ungsvermögen an die Carboxyl-Gruppe des Dipeptids. Wenn trotz-
dem stärkste katalytische Effekte auftreten, so scheint es uns
nur durch die vorstehend gegebene experimentell gestützte Annah-
me möglich, dass eine koordinative Bindung des Cer(IV)-Hydroxyds
an das Dipeptid zum Reaktionszwischenprodukt führt.

Der Cer(III)-Katalyse könnte dann folgender Vorgang zu
Grunde liegen: Durch Reaktion des $\text{Ce}(\text{OH})^{++}$ mit dem Dipeptid
entsteht primär unter Miteinbeziehung der Carboxyl-Gruppe ein
salzartiges Zwischenprodukt, dessen hohe Labilität durch den
Übergang des Cer(III)-Ions in den vierwertigen Zustand erklärt
werden könnte. Dadurch käme es auch mit diesem Katalysator letz-
tenendes zur Bildung eines nur koordinativ gebundenen Reaktions-
zwischenproduktes.

Ob bei Lanthan, bei dem, wie schon erwähnt, die festeste
Bindung der Peptid-Carboxyl-Gruppe an das $\text{La}(\text{OH})^{++}$ -Ion vorliegt,
eine ähnliche Umbildung in das eigentlich aktive Zwischenprodukt,
in dem die Carboxyl-Gruppe in freier, dissoziierter Form vorläge,

⁺) Im schwach alkalischen Milieu (pH = 8-8,6) liegen die Cer(III)-
und Lanthan-Salze als basische Salze vor (68).

als Voraussetzung des Zerfalls des Zwischenproduktes anzunehmen ist, oder ob schon das Primärprodukt für den langsamen Zerfall in Frage kommt, ist experimentell noch nicht geklärt.

Zu der Frage, worin man die Ursache für die Lösung der Peptidbindung bei der enzymatischen Katalyse sehen könnte, äussern sich A.E.Martell und M.Calvin (50). Die Autoren nehmen an, dass durch die koordinative Bindung des freien Elektronenpaares des Peptid-Stickstoffes mit dem Metall-Ion des Enzyms die stabilisierende Resonanzwirkung dieses Elektronenpaares gegenüber der Carbonyl-Gruppe aufgehoben wird. Dies verursacht eine Positivierung der Ladung des Carbonyl-Kohlenstoffes und somit eine erhöhte Reaktionsfähigkeit mit Wassermolekülen oder Hydroxyl-Ionen. Diese Fähigkeit, mit Basen zu reagieren, wird weiterhin durch die saure Natur des an das Peptid gebundenen Metall-Ions erhöht.

Von grosser Bedeutung erscheint uns zur Auslösung der metallkatalytischen Spaltung des Dipeptids die Anwesenheit des freien Carboxylat-Ion. Durch seinen elektronenanziehenden Charakter bewirkt es eine partielle Polarisierung des Moleküls und verringert die Stabilität der (C-N)-Bindung noch weiter. Dies bedingt schliesslich die Zerlegung des Dipeptids in seine Komponenten.

Die abgestufte Wirksamkeit der Katalysatoren $\text{Cer(IV)} \longrightarrow \text{Cer(III)} \longrightarrow \text{Lanthan}$ hat ihren Grund folglich darin, dass bei Cer(IV) sofort eine Anlagerung des Hydroxyds, in der vorausgehend beschriebenen Art, zu einem Zwischenprodukt erfolgt, in dem grösste Labilität der Peptidbindung vorliegt. Bei Cer(III) findet ein Übergang statt: hier liegt zunächst Salzbildung mit gebundener Carboxyl-Gruppe vor, die aber, durch Übergang des Cers von der dreiwertigen in die vierwertige Form, frei wird, wobei gleichzeitig eine Anlagerung des Cer(IV) in Form seines Hydroxyds erfolgt. Bei Lanthan endlich ist entweder der sehr langsam erfolgende Übergang des Primärproduktes in das aktive Zwischenprodukt die limitierende Reaktion oder es unterliegt bereits das Primärprodukt dem Zerfall, allerdings einem sehr langsamen.

Die peptidatischen Eigenschaften von Lanthan sowie die des 3- und 4-wertigen Cers stützen sich also auf folgende Tatsachen:

- 1) Bildung eines zerfallbaren Reaktionszwischenproduktes durch Anlagerung des Katalysators an die freien Elektronenpaare des Amino- und Imino-Stickstoffes des Dipeptids
- 2) Zerfall der Peptidbindung, bedingt durch
 - a) Aufhebung der Inaktivität der Peptidbindung durch koordinative Bindung des freien Elektronenpaares der Imino-Gruppe.
 - b) Induktive Wirkung des Carboxylat-Ions, sowie
 - c) die Tatsache, dass die Verbindung eines Metall-Ions mit einem Elektronenspender (in unserem Fall das Peptid) eine Verminderung der negativen Ladung seines Spenders zufolge hat (50).

Die von uns untersuchten Dipeptide unterlagen alle dem katalytischen Einfluss der angewandten Metall-Ionen. Sie ergeben die Unterschiede in der Umsetzungsgeschwindigkeit sowohl im Hinblick auf die Katalysatoren, als auch in Bezug auf die Substrate, sind im "Speziellen Teil" dieser Arbeit eingehend behandelt.

II. Verhalten seltener Erdmetalle gegenüber Verbindungen mit peptidartiger Bindung

1. Hippursäure

Dieses Substrat hat sich als unspaltbar mittels den von uns angewandten Metallionen gezeigt. Wir erklären dies durch das Fehlen einer freien Amino-Gruppe in der Verbindung. Die Anlagerung des Metallkatalysators kommt somit nicht zustande. Selbst nach längeren Versuchszeiten haben wir die Entstehung von Glykokoll nicht beobachten können.

Eine Reihe von Forschern (28, 37, 76) zeigen in Versuchen über die Spezifität gewisser Peptidasen, dass für die Anlagerung des Enzyms an das Substrat die Anwesenheit der freien Amino-Gruppe

notwendig ist.

Die Wichtigkeit der freien Aminogruppe für die Hydrolysierbarkeit des Substrates beleuchtet folgende Tatsache: Diese Gruppe befähigt das Metallproteid, als solche sind die Amino-peptidasen aufzufassen (54, 55), zur Chelatbildung und ermöglicht die enzymatische Spaltung. In unserem Falle gestattet sie dem Metal-Ion koordinative Bindung und somit die metallkatalytische Zerlegung des Substrates.

In dem Befund an der Hippursäure sehen wir eine wesentliche Stütze für die Richtigkeit unserer Aussage.

2. Barbitursäure

Von Interesse erschien uns auch die Einbeziehung der Barbitursäure in die Untersuchungen über den Einfluss der Lanthan-Cer(III)- und Cer(IV)-Salze auf Moleküle mit Stickstoff-Kohlenstoff-Bindung. Bei einer Versuchstemperatur von 70⁰C konnte die Entstehung von freier Malonsäure auf papierchromatographischem Wege festgestellt werden. Die Lösung der (C-N)-Bindung wird also in diesem Falle von den angewandten Metall-Ionen katalysiert. Lanthan zeigt gegenüber Cer(III)- und Cer(IV) die stärkste Aktivität.

Um eine genaue Deutung des Reaktionsmechanismus geben zu können, liegen noch zu wenig experimentelle Befunde vor. Sehr wahrscheinlich wird unter den obwaltenden Bedingungen ein echtes Chelat als Reaktionszwischenprodukt gebildet, da in der enolisierten Form der Barbitursäure, mit dem dadurch bedingten Resonanzeffekt, die Verhältnisse für eine Chelatbildung besonders begünstigt sind. Auch A.E.Martell und M.Calvin (51) messen dem Resonanzeffekt eine sehr grosse Bedeutung bei der Bildung eines Chelatkomplexsalzes zu. Die durch die Chelatbildung hervorgerufene Positivierung des Carbonyl-Kohlenstoffes würde die Reaktionsfähigkeit dieser Gruppe mit Wassermolekülen oder Hydroxyl-Ionen erhöhen und dadurch die Spaltung der (C-N)-Bindung erleichtern.

III. Metallkomplexe der Aminosäuren

Im Zusammenhang mit den Versuchen, die (C-N)-Bindung durch seltene Erdmetalle katalytisch zu zerlegen, ergibt sich auch die Frage, wie sich die Bausteine der Peptide - die Aminosäuren - unter der Einwirkung dieser Metallionen verhalten.

Die Tatsache, dass besonders Amino- bzw. Imino-Säuren bevorzugte und gute Komplexbildner mit seltenen Erdmetallen sind, ist schon länger bekannt und durch eine Reihe von Forschern untersucht (58, 20, 16, 64, 63, 62, 53, 72, 40, 69, 78, 38, 25, 8).

J.Marsh (53) sowie R.C.Vickery (70, 71) haben diese komplexbildenden Eigenschaften der Aminosäuren zur Trennung von seltenen Erdmetallen herangezogen, da die Stabilität eines Metall-Aminosäure-Komplexes sowohl mit der Natur des Metall-Ions als auch mit der Art des Elektronen-Spenders variiert.

Auch wir beobachten ein recht verschiedenartiges Verhalten entsprechend den Eigenschaften der angewandten Metall-Ionen.

Mittels der alkalischen Titration in alkoholischem Milieu (80) stellen wir fest, ob die Carboxyl-Gruppe der Aminosäure frei vorliegt oder in Form einer nicht dissoziierten salzartigen Verbindung gebunden ist.

Es ergibt sich folgender Einblick:

- 1) Lanthan besitzt das stärkste Bindungsvermögen für die Carboxyl-Gruppe.
- 2) Cer(III) bindet diese Gruppe ebenfalls, die Stabilität der Verbindung ist aber weitaus geringer.
- 3) Cer(IV) bindet die Carboxyl-Gruppe der Aminosäuren nicht. Wir folgern dies aus der Tatsache, dass schon bei der Null-Stoppung des Versuchs die freie Carboxyl-Gruppe zu erfassen ist.

Die Instabilität der Cer(III)-Komplexe erklären wir aus der Tatsache, dass ein Übergang von Cer(III) in Cer(IV) stattfindet, welcher verantwortlich für die daraus resultierende Instabilität der Komplexe ist.

R.C.Vickery (70) nimmt für die Komplexverbindungen zwischen Lanthaniden und Aminosäuren im speziellen Fall des Glykokolls folgende Formel an: $\text{Ln}(\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO}_2)_3$; daraus folgert ein Verhältnis von Lanthanid : Aminosäure = 1 : 3.

In unseren Versuchen ergab sich für das Verhältnis zwischen seltenem Erdmetall-Ion und gebundener Carboxyl-Gruppe des Glykokolls eindeutig die Relation 1:1, wie folgende Tabelle zeigt.

Tabelle 1

Verhältnis von Cer(III)-Salz zu Glykokoll
bei wechselnden Konzentrationen

(Der Vers.Ans. von 10 ml enth. 1 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6, Substratlösung und $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ in den angegebenen Konzentrationen;
t = 37°C; Zugabefolge B.
Die Zahlen geben ml 0,2n-KOH an.

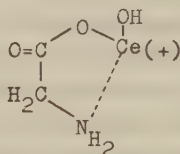
Versuchsansatz	Berechnete Werte	Erhaltene Werte (nach Stdn)		
		0	6	24
Glykokoll 0,2 Mmol Ce(III) 0,2 Mmol	14,9	14,0	14,8	14,8
Glykokoll 0,4 Mmol Ce(III) 0,2 Mmol	15,9	15,0	15,9	15,9
Glykokoll 0,4 Mmol Ce(III) 0,4 Mmol	18,8	17,2	18,6	19,0
Glykokoll 0,6 Mmol Ce(III) 0,2 Mmol	17,0	16,0	16,9	16,9
Glykokoll 0,6 Mmol Ce(III) 0,4 Mmol	20,0	18,1	19,9	19,9
Glykokoll 0,6 Mmol Ce(III) 0,6 Mmol	23,0	20,3	23,0	23,0
Glykokoll 0,2 Mmol Ce(III) 0,4 Mmol	18,0	17,1	17,9	18,0
Glykokoll 0,2 Mmol Ce(III) 0,6 Mmol	21,0	20,2	21,1	21,0

Nach R.C.Vickery (70) gibt es z w e i Arten von Koordination zwischen den Lanthaniden und den Aminosäuren:

1. den Solvatationseffekt mit nur geringer Koordination,
2. den vollen Koordinationseffekt.

"Possible there exists an equilibrium in the first effect which depresses full co-ordination and this equilibrium is destroyed by the presente of excess of aminoacid."

Unsere Reaktionsprodukte sind also in die erste Gruppe einzugliedern, bei denen nicht die gesamte Valenz des Lanthans bzw. Cers durch Aminosäuren erschöpft wird:



Um eine volle Koordination zu erzielen ist ein grosser Überschuss an Aminosäure notwendig.

Auch E.Bamann und A.Detter beschreiben organische Lanthanverbindungen (8, 25). Die Autoren beobachteten an ihnen "phosphatatische" Wirksamkeit und sehen ebenfalls auf Grund noch nicht erschöpfter Valenzen in gewissen Komplexverbindungen die Einbeziehung weiterer Verbindungen in das Komplexgefüge als möglich an: Die phosphatatische Wirksamkeit eines Lanthan-Aminoessigsäure-Komplexes wird mit zunehmender Aminosäurekonzentration erheblich vermindert.

Wir deuten diese Ergebnisse auf Grund unserer Befunde dahingehend, dass die starke Herabsetzung der phosphatatischen Aktivität, die erst mit hoher Konzentration an Aminosäure zustande kommt, die Folge der Bildung eines Koordinationsproduktes ist, in dem alle Valenzen des Lanthans durch Aminosäure-Gruppen gesättigt werden. Bei Anwesenheit nur geringer Mengen

Glykokoll hingegen besitzt das gebildete Zwischenprodukt Valenzen, die noch nicht koordinativ gesättigt und daher befähigt sind, mit dem Substrat (z.B. Glycerin-Phosphorsäure) das zerfallbare Zwischenprodukt zu bilden.

C. Spezieller Teil

I. Ergebnisse der metallkatalytischen Peptidspaltung

Hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber seltenen Erdmetallen sind überprüft: Glycyl-glycin; Glycyl-l-leucin; Glycyl-dl-alanin; Glycyl-dl-phenylalanin; Glycyl-l-tyrosin; Glycyl-l-prolin; dl-Alanyl-glycin; l-Valyl-glycin.

Zur Ermittlung des Spaltungsverlaufes dienten uns im allgemeinen chromatographische Methoden (67, 19, 36). Da im Falle des Glycyl-glycins der Unterschied in den Wanderungsgeschwindigkeiten zwischen dem unzersetzten Peptid und dessen Bausteinen nicht deutlich zu unterscheiden ist, wurde bei diesem Substrat der Reaktionsverlauf auch mittels Titration des Aciditätszuwachses, der durch Bildung von freiem Glykokoll zustande kommt, verfolgt (80).

Der Spaltungsverlauf der untersuchten Peptide ist aus den in Tabelle 2 zusammengestellten Versuchsergebnissen ersichtlich.

Daraus ist hervorzuheben:

- 1) Der Beweis für eine Spaltung der Peptide unter dem Einfluss der seltenen Erdmetall-Ionen ergibt sich durch Gegenüberstellung der angefärbten Chromatogramme von Versuchen mit und ohne Zusatz von Metall-Ionen. Dabei wird ersichtlich, dass die Konzentration der entstehenden Spaltungsprodukte mit zunehmenden Versuchszeiten sowie durch Erhöhung der Versuchstemperatur wächst. ⁺) Ohne Anwesenheit von Katalysatoren zeigen sich

⁺) Im Falle des Glycyl-l-tyrosins ist bei 70°C nach 72 Stunden eine Zersetzung des Substrates zu beobachten, welche die weitere Verfolgung des Spaltungsverlaufes verhindert.

die meisten Peptide, selbst nach längeren Versuchszeiten, bei 37°C und bei 70°C, als beständig; nur Glycyl-alanin und Alanyl-glycin weisen bei 70°C nach etwa 72 Stunden schwache Spaltung auf.

- 2) Gegenüber allen untersuchten Dipeptiden sind die Ionen des 4-wertigen Cers katalytisch am wirksamsten. Auch Cer(III)-Ionen sind gut wirksam. Der Lanthan Einfluss ist am geringsten, er tritt bei einigen Substraten (Glycyl-leucin, Glycyl-phenylalanin, Glycyl-tyrosin) erst bei höheren Versuchstemperaturen (70°C) in Erscheinung.
- 3) Die Peptide Glycyl-glycin, Glycyl-alanin und Alanyl-glycin zeigen (in Versuchen mit dem katalytisch am wenigsten wirkungsvollen Lanthan) die grösste Labilität.
- 4) Die Hydrolysebilder des Glycyl-alanin und des Alanyl-glycin geben keinen merklichen Unterschied zu erkennen. Die Art der Verknüpfung der Aminosäure ist demnach - mindestens in diesem Falle - nicht von Bedeutung, da bei dem zuerst genannten Peptid die Amino-Gruppe des Alanins, im zweiten Falle die Carboxyl-Gruppe an der Peptid-Bindung teilnimmt.

Tabelle 2

Spaltung von Festiden^{a)} durch seltene Erdesteile

(Der Vers. Ans. von 1 ml 0,1% N.N.C. Mol Sub-
strat, 0,1 Mol La-, bzw. Ce(III)-, bzw. Ce(IV)-
Salz, 1 ml 2,5% Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer
pH 9,6; Zugabe folge B.)

Reakt. dauer (Std.)	Glycyl-glycin La Ce(III)Ce(IV)Leer	Glycyl-dl-alanin La Ce(III)Ce(IV)Leer	dl-Alanyl-glycin La Ce(III)Ce(IV)Leer	Glycyl-L-leucin La Ce(III)Ce(IV)Leer	Al-phenylalanin La Ce(III)Ce(IV)Leer	Glycyl-L-tyrosin La Ce(III)Ce(IV)Leer	Glycyl-L-phenylalanin La Ce(III)Ce(IV)Leer	Glycyl-L-tryptophan La Ce(III)Ce(IV)Leer
0	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-
192	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-
192	-	-	-	-	-	-	-	-

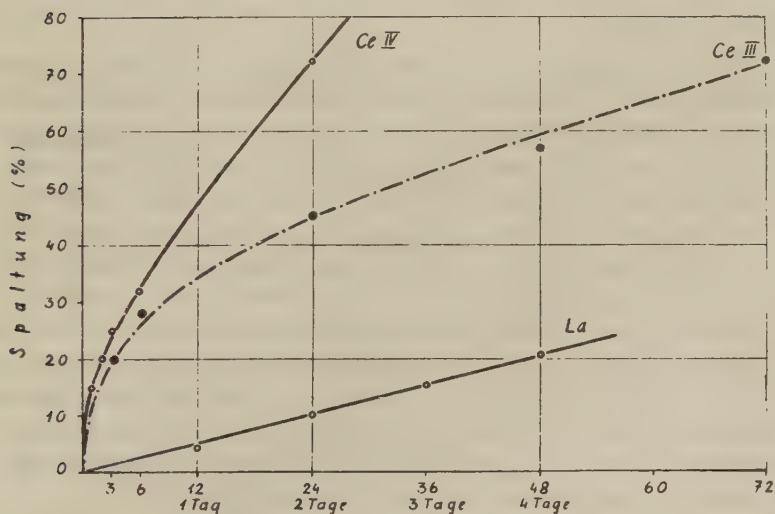
- = keine Spaltung
+ = mäßige Spaltung
++ = gute Spaltung
+++ = starke Spaltung
++++ = äußerst starke Spaltung
+++++ = stärkste Spaltung

a) Die wichtigsten zum Spaltungsverlauf gehörenden
chromatographischen Abbildungen sind am Ende
dieser Arbeit im Abschnitt E zu finden.

Abbildung 1

Hydrolyse des Glycyl-l-leucins
durch Lanthan-, Cer(III)- und Cer(IV)-Salz

(Der Vers. Ans.: von 5 ml enth. 0,0001 Mol Peptid, 0,0001 Mol La-, bzw. Ce(III)- bzw. Ce(IV)-Salz, 1 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6; t = 70°C; Zugabefolge B).



Ce IV und Ce III Zeit in Stunden, La Zeit in Tagen

10 % Spaltung werden erreicht: mit Cer(IV) in 30 Minuten.
mit Cer(III) in 60 Minuten.
mit Lanthan in 48 Stunden.

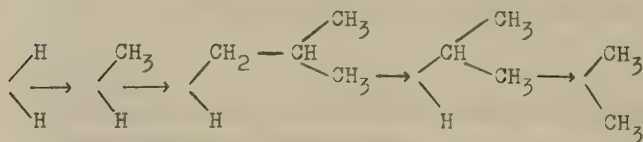
Cer(IV) zerlegt das Dipeptid zwei mal rascher als Cer(III) und 96 mal rascher als Lanthan. Cer(III) spaltet demnach das Glycyl-leucin etwa 48 mal schneller als Lanthan.

Über den Einfluss der Wasserstoffionen-Konzentration auf die Hydrolysegeschwindigkeit geben einige Versuche Aufschluss, die wir bei pH = 5,2 bzw. 8,4 bzw. 9,6 durchgeführt haben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Aus ihr ist zu entnehmen:

Das pH-Optimum der metallkatalytischen Spaltung dürfte zwischen pH = 8 und pH = 8,6 liegen. Bei einem pH = 9,5 ist zwar die Hydrolyse viel stärker; hier addiert sich aber zu der metallkatalytischen Spaltung die Wirkung der Hydroxyl-Ionen; bei dieser Wasserstoffionen-Konzentration ist nämlich die Anwesenheit freier Aminosäuren schon nach relativ kurzen Versuchszeiten auch ohne Anwesenheit eines Metallkatalysators zu beobachten. In schwach saurem Milieu (pH = 5) verläuft die Metallkatalyse bedeutend langsamer.

Über die saure (H-Ionen) und alkalische (OH-Ionen) Hydrolyse von Peptiden haben schon früher verschiedene Autoren berichtet (49,39,1,3,5,6,4,43,44,22,23). Insbesondere E.Abderrhalden und seine Mitarbeiter sowie P.A.Levene und seine Schule haben sich mit diesem Problem beschäftigt. Diese Autoren finden übereinstimmend, dass die Spaltung des Glycyl-glycins weitaus rascher vor sich geht als die der anderen Dipeptide. Auch die Glycyl-Peptide des Alanins werden leicht hydrolysiert, wobei die Hydrolyse-Konstante des Glycyl-alanins etwas grösser ist als die des Alanyl-glycins. Beide aber werden wiederum leichter hydrolysiert als die Glycyl-Peptide des Leucins und des Phenylalanins. Den grössten Widerstand zeigen Glycyl-valin und Valyl-glycin. P.A.Levene (44) hat folgende Klassifikation, nach wachsendem Stabilisations-Effekt der Seitenkette angegeben:



Auch bei der neuerdings durchgeführten Hydrolyse von Proteinen und Peptiden mittels Ionenaustauschern, insbesondere

Tabelle 3

Metallkatalytische Spaltung von Alanin-glycin ^{†)}
bei verschiedenen pH-Werten

(Der Vers. Ans. von 5 ml ent. 0,0001 Mol dl-Alanin-glycin, 0,0001 Mol La- bzw. Ce(III)- bzw. Ce(IV)-Salz. Im Falle der Versuche mit 4-wertigem Cer bei pH = 5,2 wurde die Einstellung dieses pH-Wertes durch Zugabe von 1 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer erreicht. Zugabefolge B.)

Reakt. Dauer (Std.)	pH = 5,2				pH = 8,4				pH = 9,6			
	La	CeIII	CeIV	Leer	La	CeIII	CeIV	Leer	La	CeIII	CeIV	Leer
						37°C						
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	+	++	-	+	+	++	-
6	-	-	+	-	-	+	++	-	+	++	+++	+
24	-	-	+	-	+	+	+++	-	+	++	+++	+
48	-	-	++	-	+	+	+++	-	+	+++	++++	+
72	-	-	++	-	+	++	+++	-	++	+++	++++	+
96	-	-	++	-	+	++	+++	-	+++	+++	++++	+
192	-	-	++	-	++	++	+++	-	+++	+++	+++++	+
	70°C											
0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	-	+	++	+++	-	+	+++	++++	-
6	+	+	+	-	+	++	+++	-	+	+++	++++	+
24	+	+	++	-	++	+++	++++	-	++	+++	++++	+
48	+	+	++	-	++	+++	++++	-	++	+++	+++++	++
72	+	+	+++	-	+++	+++	++++	+	+++	++++	+++++	++
96	+	+	+++	-	++++	++++	++++	+	+++	++++	+++++	+++
192	+	+	+++	-	++++	++++	++++	+	+++	++++	+++++	+++

- = keine Spaltung
+ = mässige Spaltung
++ = gute Spaltung
+++ = starke Spaltung
++++ = äusserst starke Spaltung
+++++ = stärkste Spaltung

^{†)} Die wichtigsten zum Spaltungsverlauf gehörenden chromatographischen Abbildungen sind am Ende dieser Arbeit in Abschnitt E zu finden.

durch das Resin Dowex 50 (45, 79), ist diese Stabilitäts-Reihe von neuem gefunden worden.

Es zeigt sich also folgendes:

Die Stabilität der Peptid-Bindung im Glycyl-glycin wird durch den Eintritt eines Restes verstärkt. Diese stabilisierende Wirkung ist grösser, wenn der Eintritt des Restes an dem Amino-Ende des Peptids erfolgt. Noch weitgehend wird die Peptid-Bindung stabilisiert durch Einführung zweier identischer R-Gruppen und zwar am weitgehendsten, wenn sie beide an das gleiche Kohlenstoffatom angefügt sind, anstatt sich auf beide Methylengruppen der Kette zu verteilen.

Diese Stabilitäts-Reihe wird nun erneut durch Befunde bei der metallkatalytischen Spaltung von Peptiden bestätigt.

Möglicherweise liegen hier ähnliche Verhältnisse vor, wie sie E.Bamann und W.-D.Mütterlein (59, 9) bei der metallkatalytischen Verseifung von aliphatischen Phosphorsäureestern finden - mitbedingt durch die verschieden starke Elektronen abstossende Wirkung der aliphatischen Reste.

Auch über den rascheren Verlauf der alkalischen im Vergleich zu der sauren Peptidhydrolyse sind bereits Überlegungen angestellt worden. G.Carpeni und J.Chouteau (22, 23) nehmen an, dass in einem neutralen oder sauren Milieu die Peptide durch Anlagerung von Wassermolekülen in zyklisierten Formen vorliegen und somit gegen die Einwirkung der H-Ionen geschützt sind. Im alkalischen Milieu hingegen findet eine derartige Zyklisierung nicht statt, die Peptidkette liegt hier offen vor und ist somit wesentlich stärker dem hydrolysierenden Einfluss der OH-Ionen ausgesetzt.

Zur enzymatischen Hydrolyse Vergleiche zu ziehen wird dadurch erschwert, dass die aus früheren Zeiten vorliegenden Befunde (74, 27, 28, 42, 75, 73, 29, 37, 60, 7, 30, 41, 47, 48, 76) nur bedingte Vergleichsmöglichkeiten zulassen; Herkunft und Zustand des Enzyms, nicht zuletzt die natürliche oder zusätzliche Anwesenheit von Metall-Ionen, deren Bedeutung erst ab etwa 1940 erkannt worden ist, bestimmen weitgehend dessen Aktivität und

Spezifität (2,57,56,11,12,13,54,65,66,33,34,31,35,81).

II. Einfluss seltener Erdmetalle auf die (C-N)-Bindung in der Hippursäure und in der Barbitursäure

1. Bei der Hippursäure

Dieses Substrat unterliegt nicht dem katalytischen Einfluss der seltenen Erdmetall-Ionen. Wir haben den Einfluss dieser Metall-Ionen bei wechselnden Konzentrationen und in verschiedenen pH-Bereichen geprüft. In keinem Falle ist eine messbare Spaltung zu beobachten.

2. Bei der Barbitursäure

Diese Verbindung bietet Metall-Ionen gut und verschiedenartig eine Möglichkeit zur Anlagerung. Bei 37°C ist die Verbindung noch stabil. Eine Erhöhung der Temperatur auf 70°C bewirkt jedoch Spaltung durch unsere katalytisch wirksamen Metall-Ionen. Die Aktivität des Lanthans ist hierbei weitaus stärker als die der Cer(III)- oder Cer(IV)-Ionen.

Den Nachweis der Spaltung erbringen wir durch den chromatographischen Nachweis der entstehenden Malonsäure.

Die nachstehende Tabelle gibt über die bei zwei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen erhaltenen Versuchsergebnisse eine Übersicht; der Wechsel der Konzentrationsverhältnisse wirkt sich nicht merklich aus.

Tabelle 4

Spaltung von Barbitursäure durch seltene Erdmetallionen

(Der Vers. Ans. von 5 ml enth.:

- a) Bei einer Konz. = 1:2 : 0,0001 Mol Barbitursäure,
0,0002 Mol La-, Ce(III)- oder Ce(IV)-Salz, 2 ml
2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6;
- b) Bei einer Konz. = 1:3 : 0,0001 Mol Barbitursäure,
0,0003 Mol La-, Ce(III)- oder Ce(IV)-Salz, 3 ml
2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6;
- t = 70°C; Zugabefolge B.)

Reakt. Dauer (Stdn.)	Lanthan	Ce(III)	Ce(IV)	Leer
0	-	-	-	-
6	-	-	-	-
24	++	+	+	-
48	+++	++	++	-
72	++++	+++	+++	+
96	+++++	++++	++++	++

+ = mässige Spaltung,
++ = gute Spaltung,
+++ = starke Spaltung,
++++ = äusserst starke Spaltung,
+++++ = stärkste Spaltung,
- = keine Spaltung.

III. Die Stabilität der Metallkomplexe einiger Aminosäuren

Die Ergebnisse über Komplex-Verbindungen die bei der Reaktion zwischen Metall-Ionen und Aminosäuren entstehen, sind an nachstehenden Verbindungen gewonnen: Glykokoll, d,l-Valin; d,l-Alanin; l-Glutaminsäure; d,l-Methionin sowie an l-Histidin.

1. Verhalten verschiedener Metall-Ionen mit Glykokoll

Die Versuche sind im schwach alkalischen Milieu, $\text{pH} = 8$ bis 8,6, durchgeführt.

Durch Reaktion von Lanthan mit Glykokoll entsteht eine stabile Komplexverbindung. Da bei der Null-Stopung eine Differenz zwischen berechneten und erhaltenen Titrations-Werten gemessen wird, muss die Carboxyl-Gruppe des Glykokolls im Reaktionsprodukt gebunden vorliegen. Weder bei 37°C noch bei 70°C ergibt sich, auch nach längeren Versuchszeiten, ein Aciditäts-Zuwachs. Die Verbindung ist demnach stabil.

Bei der Zugabe von Cer(III)-Ion bildet sich ebenfalls eine Komplexverbindung, sie ist jedoch instabil. Nach kurzer Zeit ergibt sich bereits ein Aciditäts-Zuwachs, der bis zur Übereinstimmung mit dem berechneten Wert fortschreitet. Die zunächst an das Cer(III)-Ion gebundene Carboxyl-Gruppe der Aminosäure wird frei und somit bei der Titration erfassbar.

Der zeitliche Verlauf des Zerfalls der primär gebildeten Cer(III)-Glykokoll-Verbindung in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen ist aus Tabelle 5 zu ersehen.

Bemerkenswert ist bei den Versuchen die Tatsache, dass bei 37°C im Schüttelthermostaten die Zerfallsgeschwindigkeit viel grösser ist als bei 70°C im Brutschrank. Dies ist durch den mechanischen Einfluss des Schüttelns bedingt, wodurch die Oxydation des Cer(III)-Ions beschleunigt und somit der raschere Zerfall des primär gebildeten Zwischenproduktes verursacht wird.

Unter den gleichen äusseren Bedingungen ist jedoch die Stabilität des Komplexes bei 37°C weitaus grösser als bei 70°C .

Tabelle 5

Zerfall des Cer(III)-Glykokoll-Komplexes

(Der Vers. Ans. von 10 ml enth. 0,0002 Mol Glykokoll, 0,0002 Mol Ce(III)-nitrat, 1 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6; Zugabefolge B.)

	Bei 37°C im Schüttelthermostaten				
Zerfall nach	15 Min.	30 Min.	45 Min.		
zu	25 %	70 %	80 %		
	Bei 37°C im Brutschrank				
Zerfall nach	2 Stdn.	3 Stdn.	5 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.
zu	30 %	40 %	50 %	85 %	100 %
	Bei 70°C im Brutschrank				
Zerfall nach	30 Min.	45 Min.	60 Min.	120 Min.	180 Min.
zu	25 %	30 %	45 %	65 %	80 %

Cer(IV)-Ion besitzt, unter unseren Versuchsbedingungen, nicht die Fähigkeit die Carboxyl-Gruppe des Glykokolls zu binden, oder, sofern dies doch der Fall sein sollte, so wird eine äusserst instabile Verbindung gebildet, da schon bei der Null-Stoppung die gemessenen Titrations-Werte mit den berechneten Werten des Alkali-Verbrauches übereinstimmen und sich bei nachfolgenden Titrationen mit zunehmenden Versuchszeiten nicht mehr verändern.

Es besteht folglich ein wesentlicher Unterschied im Verhalten der zwei Oxydations-Stufen des Cers.

Die Titrationsergebnisse sind aus Tabelle 6 zu ersehen.

Der Kupfer(II)-Glykokoll-Komplex ist bei 37°C, unabhängig ob im Schüttel- oder Ruhe-Thermostaten gehalten, stabil. Bei 70°C hingegen, beobachtet man nach längeren Versuchszeiten einen Zerfall der Verbindung. Das Verhalten entspricht unseren Erwartungen, da sich im Falle des Cu(II)-Glykokoll-Komplexes

Tabelle 6

Komplexbildung verschiedener Metall-Ionen mit Glykokoll

(Der Vers. Ans. von 10 ml enth. 0,0002 Mol Glykokoll, 0,0002 Mol La-, Ce-, Cu-, Co-, Fe-, Ni-Salz, 1 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6; Zugabefolge B.)

Die Zahlen geben den Aciditäts-Zuwachs in ml 0,2n-KOH an. ⁺)

Reakt. Dauer (Std.)	La	Ce(III)- nitrat	sulfat	Ce(IV)	Cu(II)	Co(II)	Ni(II)	Fe(II)	Fe(III)
70°C									
0 ⁺⁺)	0,60	0,75	0,80	0,10	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
3	-	0,75	-	0,10	0,00	-	-	-	-
6	-	0,80	-	-	-	-	-	-	-
24	0,00	0,75	0,85	0,15	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
48	-	0,80	0,90	-	0,40	0,00	-	-	-
72	-	-	-	-	0,60	-	-	-	-
96	0,00	0,80	-	0,10	0,85	0,00	0,00	0,00	0,00
144	0,00	-	-	-	1,05	-	-	-	-
37°C									
0 ⁺⁺)	0,60	0,85	-	0,00	0,95	0,90	1,00	0,00	-
3	-	0,75	-	-	0,10	-	-	-	-
6	-	0,80	-	-	0,10	0,00	0,00	-	-
24	0,00	0,80	-	0,10	0,10	0,00	0,00	-	-
48	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	-	-
72	0,00	0,80	-	0,10	0,00	0,00	0,00	-	-
120	-	0,85	-	-	0,10	0,00	0,00	-	-

⁺) Die Leerversuche zeigen weder bei 37°C noch bei 70°C einen Aciditäts-Zuwachs.

⁺⁺) Differenz zwischen erhaltenen und berechneten Werten bei der Null-Stopfung; ein Zerfall des Komplexes zu 100 % ist gegeben, sobald dieser Wert erreicht wird.

ebenso wie beim Lanthan-Glykokoll-Komplex - keine Oxydationsvorgänge abspielen. Deshalb hängt die Stabilität der Verbindung nicht von dem mechanischen Einfluss des Schüttelns, sondern nur von der angewandten Temperatur ab.

In Tabelle 6 sind die Titrationsergebnisse angegeben.

Nickel-Glykokoll-Komplexe bewahren sowohl bei 37°C als auch bei 70°C ihre Stabilität, während Fe(II)- und Fe(III)-Ionen keine Komplexe mit dieser Aminosäure über die Carboxyl-Gruppe bilden (vergl.auch: (52)).

Durch Zugabe von $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ zu Glykokoll kommt ein äußerst stabiles Komplexsalz zustande, das weder bei 37°C noch bei 70°C zerfällt. Auch A.E.Martell und M.Calvin zählen die Kobalt-Aminosäure-Komplexe zu den stabilsten (52).

2. Bei Alanin, Valin und Glutaminsäure

Wie aus Tabelle 7 zu entnehmen ist, besitzen Alanin und Valin geringes Anlagerungsvermögen an Cer(III)-Ionen.

Bei der Glutaminsäure, als einer zweibasigen Säure, führt die Zugabe von Cer(III)-Salz zu einer sehr unbeständigen Komplexverbindung, auf deren Instabilität sich Schütteln ebenfalls auswirkt. Mit Lanthan entsteht gleichfalls ein instabiles Reaktionsprodukt; der Zerfall hängt aber, da hier Wertigkeitswechsel ausgeschlossen ist, nur von der angewandten Temperatur ab.

Die Versuchsergebnisse gibt Tabelle 7 wieder.

3. Bei Methionin

Methionin ist ein schwacher Komplexbildner, bei $\text{pH} = 8$ bis $8,6$ zerfällt sowohl das durch Reaktion mit Cer(III)- als auch mit Lanthan-Ion primär gebildete Reaktionsprodukt. Bei einem $\text{pH} = 5$ hingegen sind beide Verbindungen stabil.

Tabelle 8 zeigt die Titrationsergebnisse.

Tabelle 7

Komplexbildung von Glutaminsäure, Alanin und Valin
mit seltenen Erdmetall-Ionen

(Der Vers. Ans. von 10 ml enth. 0,0002 Mol l-Glutaminsäure bzw. dl-Alanin, bzw. dl-Valin, 0,0002 Mol La- bzw. Ce-Salz, 1 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6; Zugabefolge B.)

Die Zahlen geben den Aciditäts-Zuwachs in ml 0,2n-KOH an. ^{†)}

Reakt. Dauer (Std.)	Glutaminsäure				Alanin	Valin
	Lanthan		Cer(III)		Cer(III)	Ce(III)
	37°C	70°C	37°C	70°C	37°C	70°C
0 ^{††)}	0,98		1,14		0,40	0,40
1/2	0,00	0,00	0,15	0,05	-	-
1	0,00	0,10	0,25	0,15	-	-
2	0,05	0,25	0,60	0,40	-	-
3	0,15	0,30	1,12	0,50	-	-
6	0,20	0,35	1,10	0,65	-	-
8	0,30	0,40	-	-	-	-
24	0,45	0,35	1,10	0,67	0,30	0,40
48	0,50	-	1,10	-	0,35	0,45

^{†)} Die Leerversuche zeigen weder bei 37°C noch bei 70°C einen Aciditäts-Zuwachs.

^{††)} Differenz zwischen erhaltenen und berechneten Werten bei der Null-Stopfung; ein Zerfall des Komplexes zu 100 % ist gegeben, sobald dieser Wert erreicht wird.

Tabelle 8

Komplexbildung von Methionin mit seltenen Erdmetall-Ionen

(Der Vers. Ans. von 10 ml enth.:

- a) Bei pH = 8,6: 0,0002 Mol dl-Methionin, 0,0002 Mol La- bzw. Ce(III)- bzw. Ce(IV)-Salz, 1,0 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6.
- b) Bei pH = 5: 0,0002 Mol dl-Methionin, 0,0002 Mol La- bzw. Ce(III)- bzw. Ce(IV)-Salz. Der Ce(IV)-Ansatz enth. Puffer um das pH = 5 konstant zu halten.

Zugabefolge B.)

Die Zahlen geben den Aciditäts-Zuwachs in ml 0,2n-KOH an. ⁺)

Reakt. Dauer (Std.)	Lanthan	Cer(III)	Cer(IV)	Lanthan	Cer(III)	Cer(IV)
	pH = 8-8,6			pH = 4,8-5,2		
37°C						
0 ++)	0,50	0,60	0,10	0,53	0,50	0,00
1/2	-	0,40	-	-	-	-
1	-	0,55	-	-	-	-
2	-	0,60	-	-	-	-
3	-	0,65	-	-	-	-
4	-	0,60	-	-	-	-
6	-	0,60	-	-	-	-
24	0,15	-	0,10	0,00	0,00	0,00
48	0,20	0,55	-	0,00	0,00	0,00
96	0,20	0,65	0,10	0,00	0,00	0,00
70°C						
1/2	-	0,40	-	-	-	-
1	-	0,50	-	-	-	-
2	-	0,55	-	-	-	-
3	-	0,60	-	-	-	-
4	-	0,60	-	-	-	-
6	-	0,60	-	-	-	-
24	0,15	0,40	0,10	0,00	0,00	0,00
48	0,20	0,55	-	0,00	0,00	0,00
96	0,20	-	0,10	0,00	0,00	0,00

⁺) Die Leerversuche zeigen weder bei 37°C noch bei 70°C einen Aciditäts-Zuwachs.

⁺⁺) Differenz zwischen erhaltenen und berechneten Werten bei der Null-Stopung; ein Zerfall des Komplexes zu 100 % ist gegeben, sobald dieser Wert erreicht wird.

4. Bei Histidin

Auch die Histidin-Komplexe sind bei pH = 5 stabil. Bei pH = 8,4 dagegen bewahrt nur die Lanthan-Histidin-Verbindung ihre Stabilität; das Reaktionsprodukt mit Cer(III)-Salz zerfällt nach kurzer Versuchszeit.

Tabelle 9

Komplexbildung von Histidin
mit seltenen Erdmetall-Ionen

(Der Vers. Ans. von 10 ml enth. 0,0002 Mol l-Histidin, 1 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6, 0,0002 Mol La-, Ce(III)- oder Ce(IV)-Salz. Zugabefolge B.)

Die Zahlen geben den Aciditäts-Zuwachs in ml 0,2n-KOH an. +)

Reakt. Dauer (Std.n.)	Lanthan		Cer(III)		Cer(IV)	
pH = 8 bis 8,6						
	37°	70°	37°	70°	37°	70°
0 ⁺⁺)	0,40		0,70		0,00	
1/2	-	-	0,40	0,20	-	-
1	-	-	0,50	0,30	-	-
2	-	-	0,70	0,50	-	-
3	-	-	0,75	0,60	-	-
5	-	-	-	0,70	-	-
6	-	-	-	0,75	-	-
24	0,00	0,30	0,70	0,75	0,00	0,10
96	0,00	0,00	0,75	0,75	0,10	0,15
pH = 4,8 bis 5,2						
0 ⁺⁺)	0,45		0,40		0,00	
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

+) Die Leerversuche zeigen weder bei 37°C noch bei 70°C einen Aciditäts-Zuwachs.

++) Differenz zwischen erhaltenen und berechneten Werten bei der Null-Stoppung; ein Zerfall des Komplexes zu 100 % ist gegeben, sobald dieser Wert erreicht wird.

Bei einer Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse zeigt sich, dass Histidin und Glykokoll unter den bisher geprüften Aminosäuren die besten Komplexbildner sind.

D. Methodischer Teil

I. Substrate

1. Peptide

- 1) Glycyl-glycin $C_4H_8O_3N_2$ (132,1), E.Merck, Darmstadt, List.Nr.4233.
- 2) Glycyl-dl-alanin $C_5H_{10}O_3N_2$ (146,1), Light's Organic Chemicals.
- 3) dl-Alanyl-glycin $C_5H_{10}O_3N_2$ (146,1), Light's Organic Chemicals.
- 4) Glycyl-l-leucin $C_8H_{16}O_3N_2$ (188,2), Dr.Th.Schuchardt, München.
- 5) Glycyl-dl-leucin $C_8H_{16}O_3N_2$ (188,2), Dr.Th.Schuchardt, München.
- 6) l-Valyl-glycin (174,2), $C_7H_{14}N_2O_3$, Max-Planck-Institut für Eiweißchemie und Lederforschung, München. ⁺)
- 7) Glycyl-prolin $C_7H_{12}O_3N_2$ (172,2), Max-Planck-Institut für Eiweißchemie und Lederforschung, München. ⁺)
- 8) Glycyl-dl-phenylalanin $C_{11}H_{14}O_3N_2$ (222,2), Light's Organic Chemicals.
- 9) Glycyl-tyrosin $C_{11}H_{14}O_4N_2$ (238,2), Dr.Th.Schuchardt, München.

⁺) Diese Substrate verdanken wir dem grosszügigen Entgegenkommen von Herrn Dr.E.Wünsch, Max-Planck-Institut für Eiweißchemie und Lederforschung, München, das unter Leitung von Herrn Professor Dr.W.Grassmann steht.

2. Aminosäuren

- 1) Glykokoll nach Sörensen, $C_2H_5O_2N$ (75,0), E.Merck,
Darmstadt, List.Nr.4201.
 - 2) dl-Alanin, $C_3H_7O_2N$ (89,0), E.Merck, List.Nr.963.
 - 3) dl-Valin, $C_5H_{11}O_2N$ (117,1), E.Merck, List.Nr.8494.
 - 4) l(+)-Glutaminsäure, $C_5H_9O_4N$ (147,1), E.Merck,
List.Nr.290.
 - 5) dl-Methionin, $C_5H_{11}O_2NS$ (149,2), E.Merck, List.Nr.500986.
 - 6) l(-)-Histidin, als $C_6H_9O_2N_3 \cdot HCl \cdot H_2O$ (209,6), E.Merck,
List.Nr.4354.
 - 7) l(-)-Histidin, als $C_6H_9O_2N_3 \cdot 2HCl$ (228,0), E.Merck,
List.Nr.4353.
3. Hippursäure, $C_4H_9O_3N$ (179,1), E.Merck, List.Nr.296.
4. Barbitursäure, $C_4H_4O_3N_2$ (128,0), E.Merck, List.Nr.133.

II. Metallsalze

- 1) $La(NO_3)_3 \cdot 6 H_2O$ p.a. E.Merck (List.Nr.5326);
- 2) $Ce(NO_3)_3 \cdot 6 H_2O$ p.a. E.Merck (List.Nr.2271);
- 3) $Ce(SO_4)_2 \cdot 4 H_2O$ p.a. E.Merck (List.Nr.2274);
- 4) $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$ p.a. E.Merck (List.Nr.2790);
- 5) $FeCl_2 \cdot 4 H_2O$ p.a. E.Merck (List.Nr.3861);
- 6) $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ p.a. E.Merck (List.Nr.3943);
- 7) $Co(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$ p.a. E.Merck (List.Nr.2535);
- 8) $NiCl_2 \cdot 6 H_2O$ p.a. E.Merck (List.Nr.6719);
- 9) $Ce_2(SC_4)_3 \cdot 8 H_2O$ p.a. E.Merck (List.Nr.2268).

III. Der Versuchsansatz

1. Bei der titrimetrischen Methode

Der Versuchsansatz von 10 ml enthielt 1 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6, Substratlösung und Cer- bzw. Lanthan-Salz in der jeweils angegebenen Konzentration. Die Reaktionsteilnehmer gaben wir in der vorstehenden Reihenfolge zusammen (Zugabefolge B) (14). Das pH des Versuchsmilieus wurde ständig überprüft und wenn nötig durch Zugabe weniger Tropfen einer 2,5n-Ammonium-Hydroxyd-Lösung auf den erwünschten Wert gebracht. Bei pH = 5 war die Zugabe von Puffer (2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer) nur bei den Versuchen mit Cer(IV) erforderlich.

Die Reaktionsgemische wurden in Schüttelkolben von etwa 100 ccm mit eingeschliffenem Glasstopfen während der Reaktionsdauer bei 37°C im Schüttelthermostaten und bei 70°C im Ruethermostaten unter gelegentlichem Schütteln gehalten. Die Nullstoppungen erfolgten stets sofort nach dem Zusammengeben der Reaktionsteilnehmer.

Die angegebenen Titrationswerte sind jeweils in zwei Parallelversuchen durch Doppelbestimmung ermittelt; die Titration der Ansätze erfolgt zweckmässig in den Schüttelkolben selbst

2. Bei der chromatographischen Methode

a) Versuche mit Peptiden und der Hippursäure

Das Reaktionsgemisch von 5 ml enthielt 1 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, 0,0001 Mol Peptid, 0,0001 Mol Cer- bzw. Lanthan-Salz. Das Reaktionsmilieu wurde durch Zugabe weniger Tropfen einer 2,5n-Ammonium-Hydroxyd-Lösung, wenn erforderlich, auf dem geforderten pH-Wert gehalten. Wir hoben die Reaktionsgemische bei den Temperaturen von 37°C und 70°C unter den schon oben genannten Bedingungen auf.

Die dem Reaktionsgemisch zum Auftragen der Chromatogramme

jeweils entnommenen Proben betrugen in der Regel 0.03 ml.

b) Versuche mit der Barbitursäure

Die Versuche gingen in zwei Konzentrationen vor sich. In einen Falle enthielt der Versuchsansatz von 5 ml 0,0001 Mol Substrat, 0,0002 Mol Lanthan- bzw. Cer-Salz, 2 ml 2,5n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 8,6, im anderen war das Verhältnis Substrat-Katalysator = 1 : 3, dementsprechend enthielt der Ansatz 3 ml Puffer (Zugabefolge B). Die gewünschte Wasserstoffionen-Konzentration wurde durch Zugabe weniger Tropfen einer 2,5n-Ammonium-Hydroxydlösung konstant gehalten.

IV. Titrimetrische Methode

Die bei der Spaltung von Peptiden ebenso wie bei dem Zerfall der Komplexverbindungen zwischen Aminosäuren und Metall-Ionen entstehende freie Carboxyl-Gruppe bestimmten wir mittels Titration im alkoholischen Milieu nach der Methode von R.Willstätter und E.Waldschmidt-Leitz (80). Wir verwendeten 0,2n-alkoholische Kalilauge und Thymolphthalein als Indikator.

V. Chromatographische Methoden

1. qualitative

Zum Nachweis der bei der Spaltung von Peptiden entstehenden Aminosäuren sowie der unzersetzten Substrate haben wir chromatographische Methoden herangezogen. Am besten bewährte sich das aufsteigende Verfahren (Papier Schleicher & Schüll 2043 b Mgl) in einem Gemisch aus n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 als Entwicklungsflüssigkeit. Die Anfärbung der Chromato-

gramme erfolgte mittels Ninhydrin: ("Merck" List.Nr.6762). Um die entstehenden Flecke haltbar zu machen, wurden sie mit Hilfe des folgenden Sprühreagenzes in ihre Kupferkomplexe übergeführt: 1 ml gesättigte Kupfernitratlösung wird mit 0,02 ml Salpetersäure p.a. (etwa 65%ig, "Merck") versetzt und mit 95%igem Methanol auf 100 ml aufgefüllt.

Zum Nachweis der bei der Spaltung von Barbitursäure entstehenden Malonsäure chromatographierten wir aufsteigend in einem Gemisch von 100 ml n-Butanol-Benzoesäuremethylester (1:1) + 20 ml Ameisensäure ("Merck"). Zur Sichtbarmachung der Flecke verwendeten wir das Sprühreagenz nach E.W.Denison und E.F. Phaves (24) eine neutralisierte oder schwach alkalische Bromkresolgrünlösung (0,04% in 95%igem Äthanol).

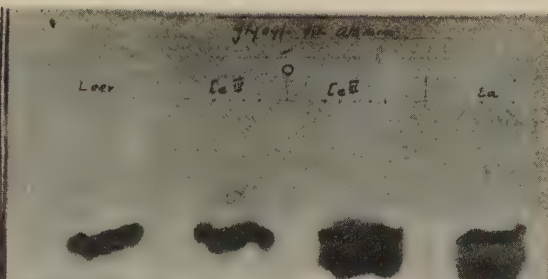
2. quantitative

Den quantitativen Spaltungsverlauf von Glycyl-leucin haben wir nach der von W.Grassmann, K.Hannig und M.Plöckel (36) angegebenen Methode ermittelt. Auf 12 cm breiten Streifen (Schleicher & Schüll 2043 b Mgl) wurden die Versuchsproben aufgetragen und in einem Gemisch Butanol:Eisessig:Wasser 4:1:5 aufsteigend chromatographiert. Das von J.Brüggemann und K.Drepper (21) angegebene Ninhydrinsprühreagenz diente zur Anfärbung der Chromatogramme. Die Flecken wurden nach der Trocknung in zwei Glasplatten eingebettet, mit Transparenzlösung (α -Bromphenolphthalein in Paraffinöl, Brechungsindex = 1,51) durchtränkt und bei einer Wellenlänge von 546m μ photometriert. Die erhaltenen Kurven werteten wir planimetrisch aus. Zu jeder Messung haben wir eine Eichkurve von mitchromatographiertem Glykoll aufgestellt.

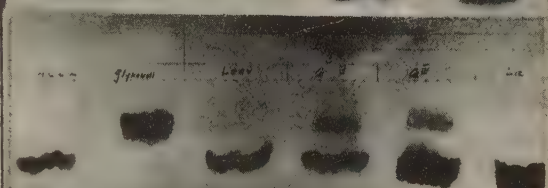
E. A n h a n g

Chromatographische Abbildungen

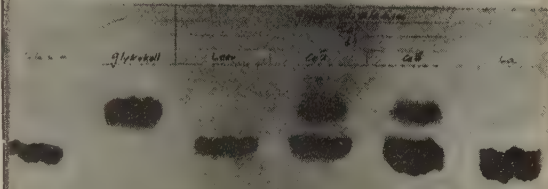
Substrat:
 Glycyl-dl-alanin
 Vers. Zeit:
 Null-Stoppung
 Vers. Medium:
 $p_H = 8,3$



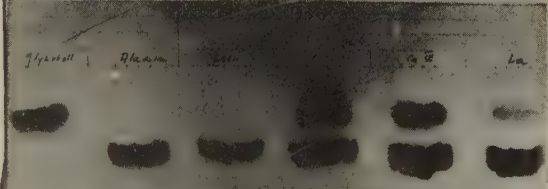
Substrat:
 Glycyl-dl-alanin
 Vers. Zeit:
 3 Stunden
 Vers. Temp.:
 $70^{\circ}C$
 Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



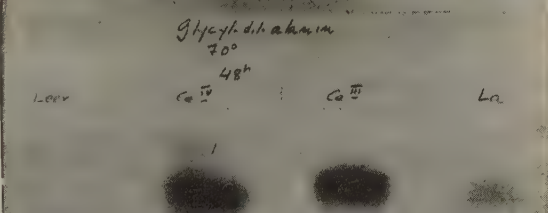
Substrat:
 Glycyl-dl-alanin
 Vers. Zeit:
 6 Stunden
 Vers. Temp.:
 $70^{\circ}C$
 Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



Substrat:
 Glycyl-dl-alanin
 Vers. Zeit:
 24 Stunden
 Vers. Temp.:
 $70^{\circ}C$
 Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



Substrat:
 Glycyl-dl-alanin
 Vers. Zeit:
 48 Stunden
 Vers. Temp.:
 $70^{\circ}C$
 Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



Substrat:
 Glycyl-dl-alanin
 Vers. Zeit:
 72 Stunden
 Vers. Temp.:
 $70^{\circ}C$
 Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



Substrat:

Glycyl-dl-alanin

Vers. Zeit :

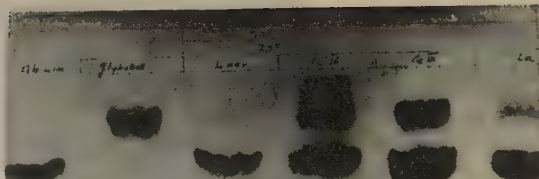
72 Stunden

Vers. Temp.:

70°C

Vers. Milieu:

pH = 8,3

Substrat :

Glycyl-dl-alanin

Vers. Zeit :

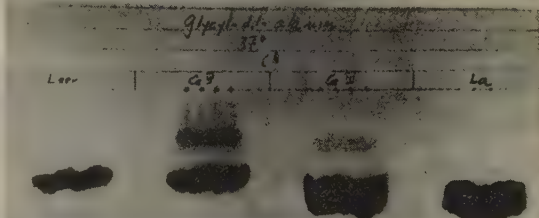
6 Stunden

Vers. Temp. :

37°C

Vers. Milieu:

pH = 8,3

Substrat:

Glycyl-dl-alanin

Vers. Zeit:

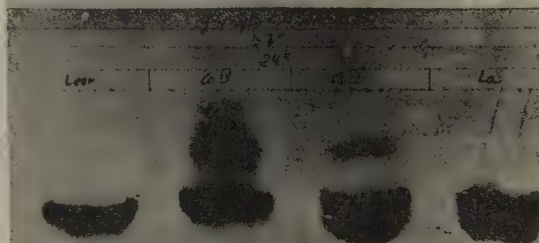
24 Stunden

Vers. Temp.:

37°C

Vers. Milieu:

pH = 8,3

Substrat:

dl-Alanyl-glycin

Vers. Zeit:

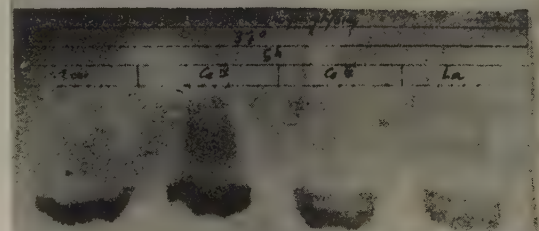
5 Stunden

Vers. Temp.:

37°C

Vers. Milieu:

pH = 5,2

Substrat:

dl-Alanyl-glycin

Vers. Zeit:

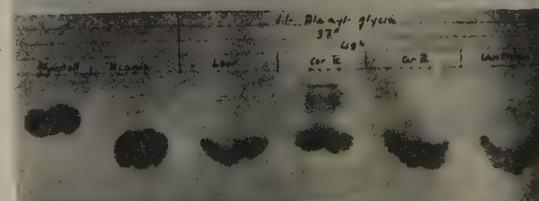
48 Stunden

Vers. Temp.:

37°C

Vers. Milieu:

pH = 5,2

Substrat:

dl-Alanyl-glycin

Vers. Zeit:

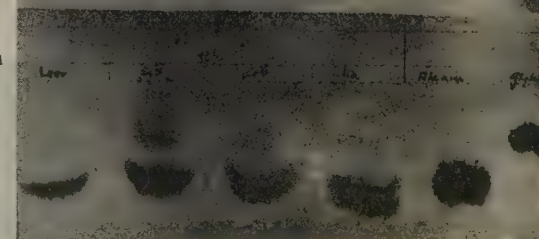
96 Stunden

Vers. Temp.:

37°C

Vers. Milieu:

pH = 5,2



Substrat:

dl-Alanyl-glycin

Vers. Zeit:

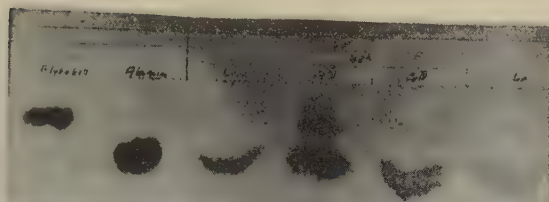
48 Stunden

Vers. Temp.:

70°C

Vers. Milieu:

p_H = 5,2



Substrat:

dl-Alanyl-glycin

Vers. Zeit:

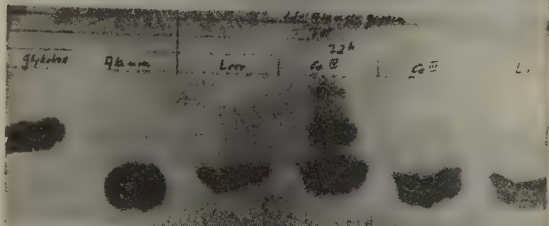
72 Stunden

Vers. Temp.:

70°C

Vers. Milieu:

p_H = 5,2



Substrat:

dl-Alanyl-glycin

Vers. Zeit:

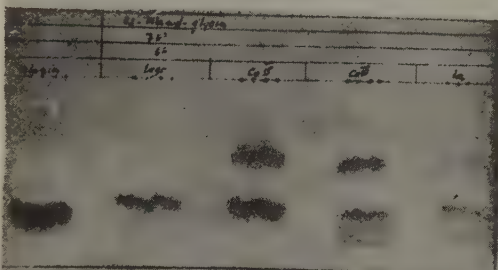
6 Stunden

Vers. Temp.:

70°C

Vers. Milieu:

p_H = 8,3



Substrat:

dl-Alanyl-glycin

Vers. Zeit:

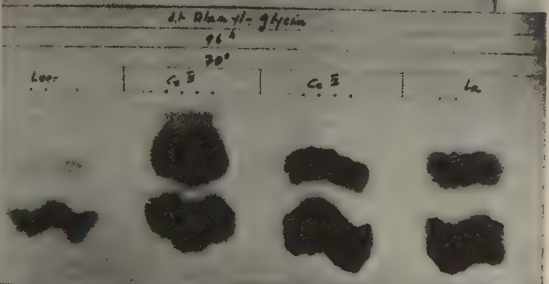
96 Stunden

Vers. Temp.:

70°C

Vers. Milieu:

p_H = 8,3



Substrat:

dl-Alanyl-glycin

Vers. Zeit:

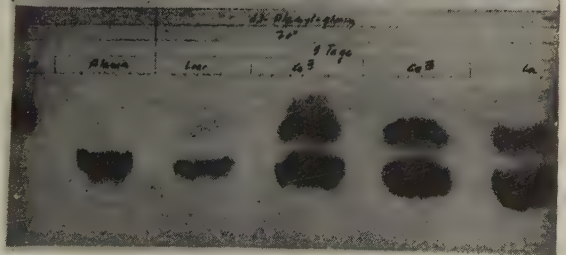
216 Stunden

Vers. Temp.:

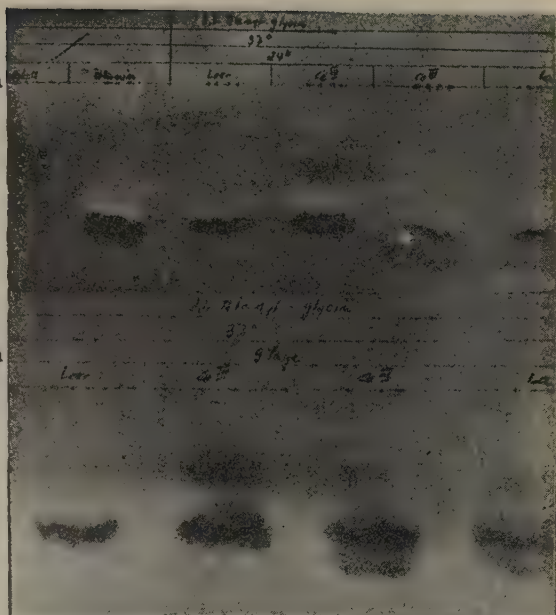
70°C

Vers. Milieu:

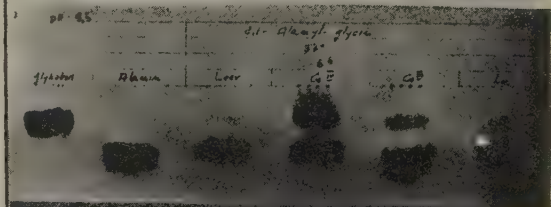
p_H = 8,3



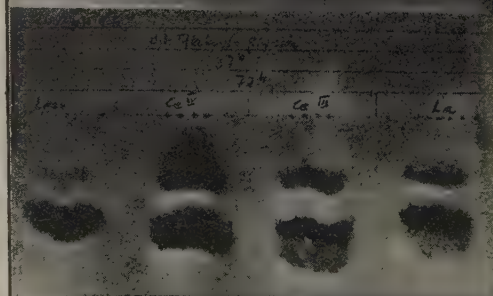
Substrat:
 dl-Alanyl-glycin
Vers. Zeit:
 24 Stunden
Vers. Temp.:
 37°C
Vers. Milieu:
 pH = 8,3



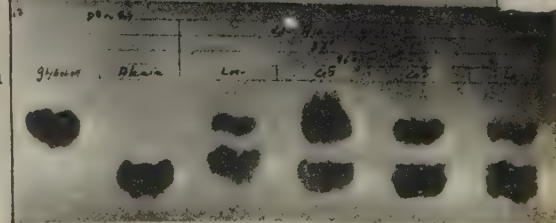
Substrat:
 dl-Alanyl-glycin
Vers. Zeit:
 216 Stunden
Vers. Temp.:
 37°C
Vers. Milieu:
 pH = 8,3



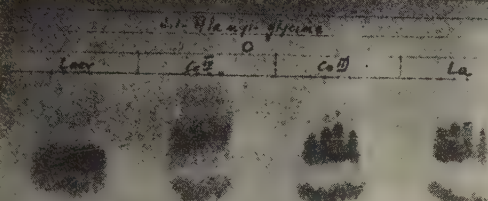
Substrat:
 dl-Alanyl-glycin
Vers. Zeit:
 72 Stunden
Vers. Temp.:
 37°C
Vers. Milieu:
 pH = 9,5



Substrat:
 dl-Alanyl-glycin
Vers. Zeit:
 96 Stunden
Vers. Temp.:
 37°C
Vers. Milieu:
 pH = 9,5



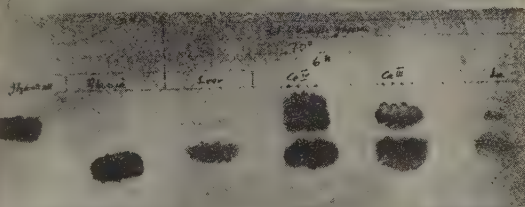
Substrat:
dl-Alanyl-glycin
 Vers. Zeit:
 Null-Stoppung
 Vers. Milieu:
 $p_H = 9,5$



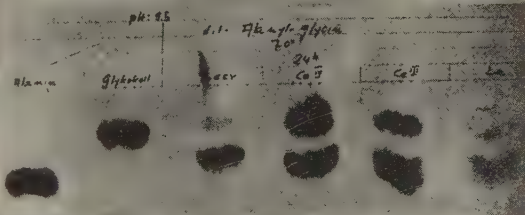
Substrat:
dl-Alanyl-glycin
 Vers. Zeit:
 3 Stunden
 Vers. Temp.:
 $70^{\circ}C$
 Vers. Milieu:
 $p_H = 9,5$



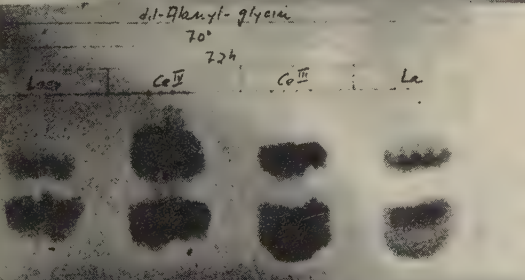
Substrat:
dl-Alanyl-glycin
 Vers. Zeit:
 6 Stunden
 Vers. Temp.:
 $70^{\circ}C$
 Vers. Milieu:
 $p_H = 9,5$



Substrat:
dl-Alanyl-glycin
 Vers. Zeit:
 24 Stunden
 Vers. Temp.:
 $70^{\circ}C$
 Vers. Milieu:
 $p_H = 9,5$



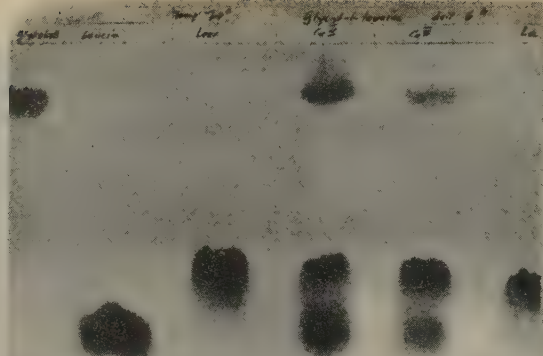
Substrat:
dl-Alanyl-glycin
 Vers. Zeit:
 72 Stunden
 Vers. Temp.:
 $70^{\circ}C$
 Vers. Milieu:
 $p_H = 9,5$



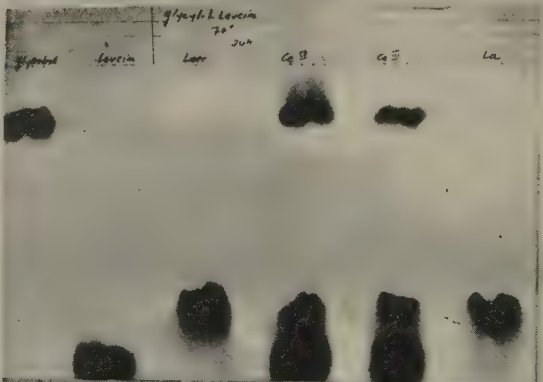
Substrat:
dl-Alanyl-glycin
 Vers. Zeit:
 96 Stunden
 Vers. Temp.:
 $70^{\circ}C$
 Vers. Milieu:
 $p_H = 9,5$



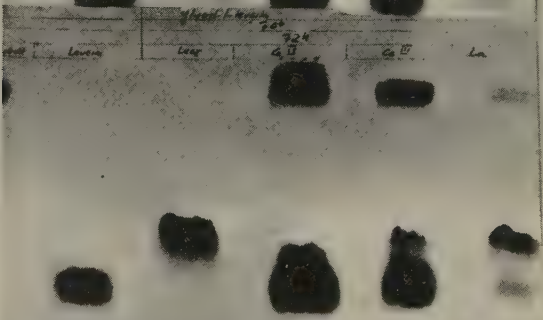
Substrat:
 Glycyl-1-leucin
Vers. Zeit:
 6 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



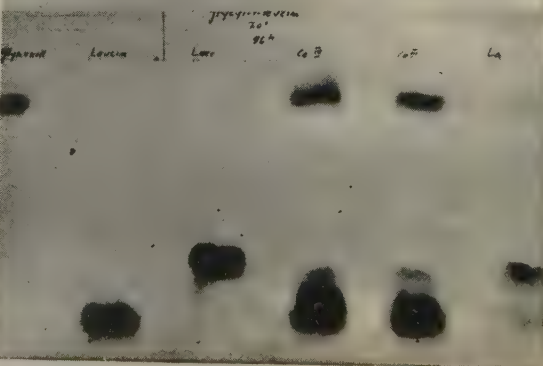
Substrat:
 Glycyl-1-leucin
Vers. Zeit:
 24 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



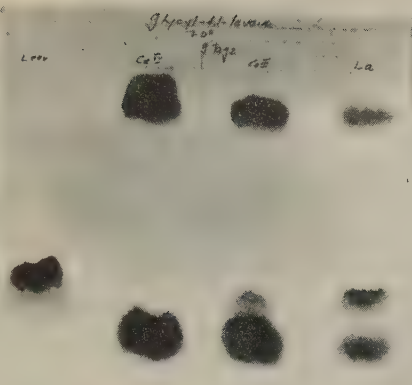
Substrat:
 Glycyl-1-leucin
Vers. Zeit:
 72 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



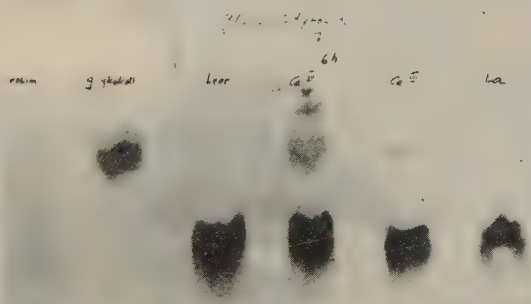
Substrat:
 Glycyl-1-leucin
Vers. Zeit:
 96 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



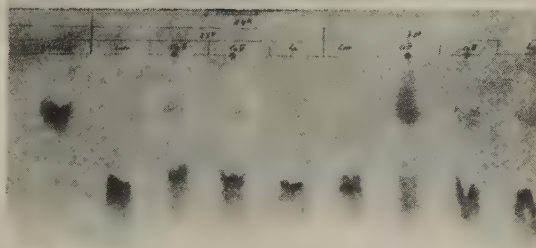
Substrat:
 Glycyl-1-leucin
Vers. Zeit:
 216 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



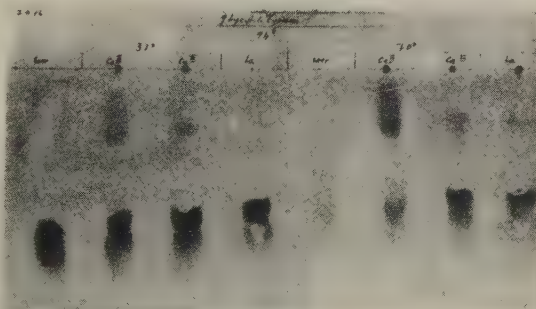
Substrat:
 Glycyl-1-tyrosin
Vers. Zeit:
 6 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



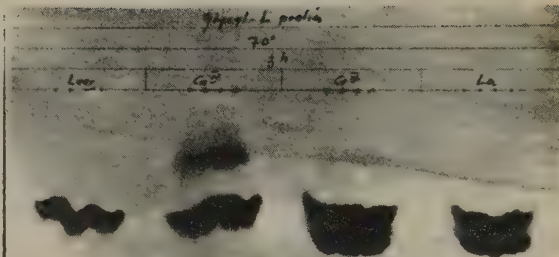
Substrat:
 Glycyl-1-tyrosin
Vers. Zeit:
 24 Stunden
Vers. Temp.:
 37°C, bzw. 70°C
Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



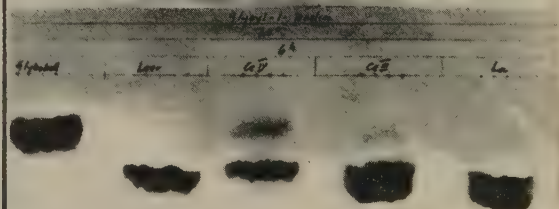
Substrat:
 Glycyl-1-tyrosin
Vers. Zeit:
 96 Stunden
Vers. Temp.:
 37°C, bzw.
Vers. Milieu:
 $p_H = 8,3$



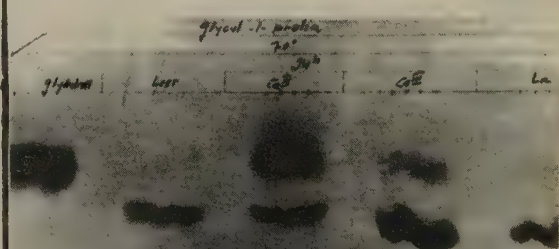
Substrat:
 Glycyl-1-prolin
Vers. Zeit:
 3 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
Vers. Milieu:
 pH = 8,3



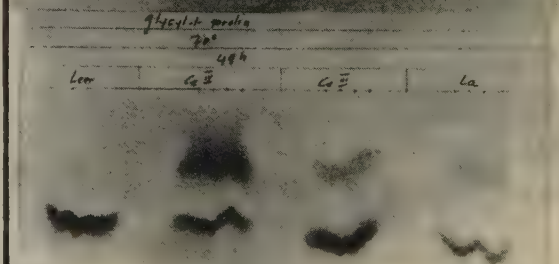
Substrat:
 Glycyl-1-prolin
Vers. Zeit:
 6 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
Vers. Milieu:
 pH = 8,3



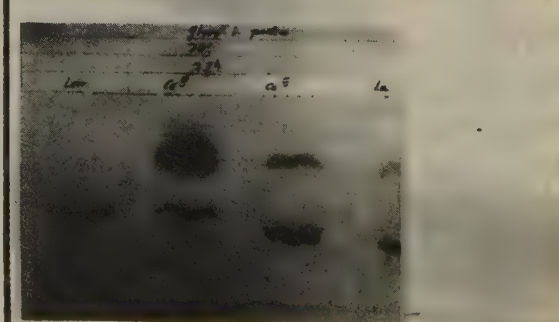
Substrat:
 Glycyl-1-prolin
Vers. Zeit:
 24 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
 pH = 8,3



Substrat:
 Glycyl-1-prolin
Vers. Zeit:
 48 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
Vers. Milieu:
 pH = 8,3



Substrat:
 Glycyl-1-prolin
Vers. Zeit:
 72 Stunden
Vers. Temp.:
 70°C
Vers. Milieu:
 pH = 8,3



Substrat:

Glycyl-dl-phenylalanin

Vers. Zeit:

3 Stunden

Vers. Temp.:

70°C

Vers. Medium:

pH = 8,3

Substrat:

Glycyl-dl-phenylalanin

Vers. Zeit:

48 Stunden

Vers. Temp.:

70°C

Vers. Medium:

pH = 8,3

Substrat:

Glycyl-dl-phenylalanin

Vers. Zeit:

96 Stunden

Vers. Temp.:

70°C

Vers. Medium:

pH = 8,3

Substrat:

Glycyl-dl-phenylalanin

Vers. Zeit:

216 Stunden

Vers. Temp:

70°C

Vers. Medium:

pH = 8,3

F. Literaturverzeichnis

- (1) Abderhalden, E. u. H. Brockmann: Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 170, 146 (1927)
- (2) Abderhalden, E. u. G. Effkemann: Fermentforschung 14 (N.F.7) 27 (1933)
- (3) Abderhalden, E. u. H. Mahn: Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 169, 196 (1927)
- (4) Abderhalden, E. u. H. Mahn: Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 174, 75 (1928)
- (5) Abderhalden, E. u. H. Sickl: Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 170, 134 (1927)
- (6) Abderhalden, E. u. Sh. Suzuki: Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 170, 159 (1927)
- (7) Ambros, O. u. A. Harteneck: Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 184, 94 (1929)
- (8) Bamann, E. u. A. Detter: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 289/61, 428 (1956)
- (9) Bamann, E. u. W.-D. Mütterlein: Noch unveröffentlicht
- (10) Bamann, E., A. Rother u. H. Trapmann: Naturwissenschaften 14, 326 (1956)
- (11) Bamann, E. u. O. Schimke: Biochem. Z. 308, 130 (1941)
- (12) Bamann, E. u. O. Schimke: Biochem. Z. 310, 119 (1941)
- (13) Bamann, E. u. O. Schimke: Biochem. Z. 310, 302 (1941/42)
- (14) Bamann, E. u. E. Nowotny: Chem. Ber. 81, 442 (1948)
- (15) Baudet, P. et E. Cherbuliez: Helv. chim. Acta. 38, 841 (1955)
- (16) Beck, G.: Helv. chim. Acta 29, 357 (1946)
- (17) Bergmann, M. u. L. Zervas: Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 224, 17 (1934)
- (18) Birkhofer, L. u. I. Hartwig: Chem. Ber. 90, 260 (1957)
- (19) Bode, F.: Biochem. Z. 326, 433 (1955)
- (20) Brintzinger, H., H. Thiele u. U. Müller: Z. anorg. allg. Chem. 251, 285 (1943)
- (21) Brüggemann, J. u. K. Drepper: Naturwissenschaften 39, 301 (1952)
- (22) Carpéni, G. et J. Chouteau: C.R. hebd. Seances Acad. Sci. 236, 1354 (1953)

- (23) Carpéni, G. et J. Chouteau: J.Chim.physique Physico-Chim. biol. 50, 267 (1953)
- (24) Denison, E.W. u. E.F. Phaves: Z.anal.chem. 140, 202 (1953)
- (25) Detter, A.: Dissertation Univ.München 1955
- (26) Dobbie, H., Kermack, W.O. and H. Lees: Biochem.J. 59, 240 (1955)
- (27) v. Euler, H. u. K. Josephson: Ber.dtsch.chem.Ges. 59, 230 (1926)
- (28) v. Euler, H. u. K. Josephson: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 157, 122 (1926)
- (29) v. Euler, H. u. Z. Kertész: Ber.dtsch.chem.Ges. 61, 1525 (1928)
- (30) v. Euler, H., S. Myrbäck u. K. Myrbäck: Ber.dtsch.chem.Ges. 62, 2194 (1929)
- (31) Fleischer, G.A.: J.biol.Chem. 205, 925 (1953)
- (32) Goldschmidt, S. u. W. Fünér: Liebigs Ann.Chem. 483, 190 (1930)
- (33) Goudot, A.: C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 232, 1479 (1951)
- (34) Goudot, A.: C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 235, 1396 (1952)
- (35) Goudot, A.: C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 240, 778 (1955)
- (36) Grassmann, W., K. Hannig u. M. Plöckl: Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 299, 258 (1955)
- (37) Grassmann, W. u. H. Dyckerhoff: Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 175, 19 (1928)
- (38) Hiram, E.H., J. Greenberg, R. Lewin, H. Spencer, K.G. Stern and D. Laszlo: J.Lab.clin.Med. 46, 182 (1955)
- (39) Jaitschnikow, J.S.: Journ.Russ.phys.-chem.ges.(russ.) 58, 1373 (1926) nach: Chem.Zbl. 1927, II, 1143
- (40) James, J.: J.chem.Soc.(London) 1951, 2233
- (41) Levene, P.A., L. Bass and R.E. Steiger: J.biol.Chem. 81, 223 (1929)
- (42) Levene, P.A. and H.S. Simms: J.biol.Chem. 70, 260 (1926)
- (43) Levene, P.A. and R.E. Steiger: J.biol.Chem. 82, 167 (1929)
- (44) Levene, P.A., R.E. Steiger and A. Rothen: J.biol.Chem. 97, 717 (1932)
- (45) Lawrence, L. and W.J. Moore: J.Am.Chem.Soc. 73, 3973 (1951)
- (46) Li, N.C. and E. Doody: J.Am.Chem.Soc. 74, 4182 (1952)
- (47) Linderstrøm-Lang, K.: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 182, 151 (1929)

- (48) Linderstrøm-Lang, K. u. Masakatu Sato: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 184, 83 (1929)
- (49) Lütcke, M.: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 141, 100 (1924)
- (50) Martell, A.E. and M.Calvin: Chemistry of the Metal Chelate Compounds. New York 1953 S.407
- (51) Martell, A.E. and M.Calvin: Chemistry of the Metal Chelate Compounds. New York 1953 S.160
- (52) Martell, A.E. and M.Calvin: Chemistry of the Metal Chelate Compounds. New York 1953 S.170
- (53) Marsh, J.K.: J.chem.Soc.(London) 1950, 1879; ebenda, 1951, 1461
- (54) Maschmann, E.: Chemiker-Ztg. 67, 280 (1943)
- (55) Maschmann, E.: Biochem.Z. 309, 179 (1941)
- (56) Maschmann, E.: Biochem.Z. 302, 332 (1939); ebenda, 307, 1 (1940); ebenda, 308, 359 (1942); ebenda, 309, 179 (1941); ebenda, 313, 129 (1942); ebenda, 315, 125 (1943)
- (57) Maschmann, E.: Naturwissenschaften 26, 791 (1938); ebenda, 28, 765 (1940); ebenda, 28, 780 (1940); ebenda, 29, 691 (1941); ebenda, 31, 136 (1943)
- (58) Meyer, R.J. u. U.Müller: Z.anorg.allg.Chem. 109, 1 (1919)
- (59) Mütterlein, W.-D.: Dissertation Univ.München 1956
- (60) Northrop, J.H. and H.Sirms: J.gen.Physiol. 12, 313 (1928)
- (61) Perkin, D.J.: Biochem.J. 57, 702 (1954)
- (62) Rjabtschikow u. Terentjew: Nachr.Akad.Wiss.UdSSR, Abt.chem.Wiss. 1949, 44; nach: Chem.Zbl. 1951, I, 1280
- (63) Schwarzenbach, G.: Allgemeine und anorganische Chemie, S.319, Stuttgart 1948
- (64) Schwarzenbach, G.: Helv.chim.Acta. 28, 1133 (1945) ebenda, 32, 839 (1949)
- (65) Smith, E.L.: J.biol.Chem. 176, 9 (1948)
- (66) Smith, E.L.: In Sumner, J.B. u. K.Myrbäck: The Enzyms. New York 1950. Vol.I S.819 und 831
- (67) Sulser, H. u. H.Keskin: Mitt.Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. [Bern] 45, 295 (1954)

- (68) Vickery, R.C.: Chemistry of the Lanthanons, S.213
London 1953
- (69) Vickery, R.C.: Chemistry of the Lanthanons, S.241
London 1953
- (70) Vickery, R.C.: J.chem.Soc.(London) 1950, 2058
- (71) Vickery, R.C.: J.chem.Soc.(London) 1952, 4357
- (72) Vickery, R.C.: J.chem.Soc.(London) 1950, 1101, 1819;
ebenda, 1950, 2058; ebenda, 1951, 1817;
ebenda, 1952, 421; ebenda, 1952, 4357;
ebenda, 1952, 1895; ebenda, 1954, 385
- (73) Waldschmidt-Leitz, E. u. J.Graser: Hoppe-Seyler's
Z.physiol.Chem. 166, 247 (1927)
- (74) Waldschmidt-Leitz u. A.Harteneck: Hoppe-Seyler's
Z.physiol.Chem. 147, 286 (1925); ebenda,
149, 203 (1925)
- (75) Waldschmidt-Leitz, E. u. A.Schäffner: Hoppe Seyler's
Z.physiol.Chem. 151, 31 (1926)
- (76) Waldschmidt-Leitz, E. u. G.Schuckmann: Hoppe-Seyler's
Z.physiol.Chem. 184, 56 (1929)
- (77) Weiss, B.: J.biol.Chem. 205, 193 (1953)
- (78) Wheelwright, E.J., Speeding, F.H. and G.Schwarzenbach:
J.Am.Chem.Soc. 75, 4196 (1953)
- (79) Whitaker, J.R. and F.E.Deatherage: J.Am.Chem.Soc. 77,
3360 (1955)
- (80) Willstätter, R. u. E.Waldschmidt-Leitz: Ber.dtsch.
chem.Ges. 54, 2988 (1921)
- (81) Wolff, G.H. u. S.Fallab: Helv.Chim.Acta 39, 999 (1956).

Lebenslauf

Am 14. Juli 1931 wurde ich Ana R o t h e r als Tochter des Regierungsbaurats Leopold R o t h e r und seiner Ehefrau Susanna geb. Treuenfels in Brandenburg/Havel geboren. Da mein Vater später als Regierungsbeamter des Columbianischen Staates nach Bogotá/Colombia übersiedelte, besuchte ich dort das Realgymnasium der Klosterschule Santa Clara, bis ich im Jahre 1947 die Reifeprüfung absolvierte und damit das "Diploma de Bachiller" erhielt.

Daraufhin begann ich mein Studium der Pharmazie an der dortigen Universität, das ich nach der pflichtmässigen Dauer von acht Semestern mit dem Pharmazeutischen Staatsexamen im Dezember 1951 abschloss.

Nachdem ich in den folgenden zwei Jahren als Assistentin an dem Pharmazeutischen Institut der Universidad Nacional Bogotá tätig gewesen war, begab ich mich nach München, um an der hiesigen Universität im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie mit den praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Herrn Professor Dr. E. B a m a n n zu beginnen.

